



関西学院大学リポジトリ

Kwansei Gakuin University Repository

# 海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* におけるリン酸獲得機構の解明

著者	木村 奈々恵
発行年	2017
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10236/00027079">http://hdl.handle.net/10236/00027079</a>

## 海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* における

### リン酸獲得機構の解明

関西学院大学大学院理工学研究科  
生命科学専攻 松田研究室 木村奈々恵

【研究目的】リンは地球上の生命にとって必要不可欠な主要元素である。しかしリンの埋蔵量は限られており、近い将来枯渇が懸念されている。微生物および植物においてリン酸 (Pi) 飢餓環境下で Pi を集めるための主要な戦略として、Pi 輸送体を細胞膜上に発現させることが知られている。当研究室の先行研究において、Pi 輸送体として同定されているタンパク質のアミノ酸配列をもとに、羽状目海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* の Pi 輸送体候補遺伝子を探索した。その結果、*P. tricornutum* のゲノム上には哺乳類の SLC34、SLC20、及び酵母の Pho84 ファミリーと相同性を示す 11 個の遺伝子が発見されたが、その機能は未同定である。海洋性珪藻類は地球上の一次生産の 20%を担う主要な生産者であり、海洋に散逸したリンを集積し、反重力方向へリン循環を駆動する生物機構の始発点としても極めて重要な役割を担う。本研究では羽状目海洋性珪藻 *P. tricornutum* における Pi 輸送体の機能同定を目的とした。

【実験方法】*P. tricornutum* の Pi 輸送体候補 (PtSLC34-2 および PtSLC34-5) の機能解析を行うために、PtSLC34-2 および PtSLC34-5 の RNAi 株を作製した。標的遺伝子を条件特異的にノックダウンするために、硝酸培地で RNA 干渉を誘導するコンストラクトを作成し、このコンストラクトを野生型 *P. tricornutum* に導入した。得られた RNAi 株は、硝酸を N 源とした高 Pi 環境 (200  $\mu$  M) 及び Pi 飢餓環境 (0  $\mu$  M) に順化させ、Pi 取り込み活性を測定した。Pi 取り込み活性は、100  $\mu$  M の Pi を含む培地に細胞を懸濁し、培地中の Pi の減少速度をマラカイトグリーン法で測定した。次に、PtSLC34-2 および PtSLC34-5 の C 末端側に 3×FLAG tag (以下 FLAG と表記) を融合させたタンパク質を定常的に発現させるコンストラクトを作製し、*P. tricornutum* に導入した。抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロットにより、FLAG 融合タンパク質を発現した株を選別した。得られた株を高 Pi および Pi 飢餓環境に順化させ、Pi 取り込み活性を測定した。FLAG 融合タンパク質の発現が定常的であることを確認するために、高 Pi および Pi 飢餓環境で培養した細胞においても FLAG 融合タンパク質の蓄積量を確認した。

【実験結果と考察】Pi 輸送体候補 PtSLC34-5 および PtSLC34-2 の RNAi 株の Pi 取り込み活性を測定した結果、PtSLC34-5 RNAi 株は WT と同程度の取り込み活性を示したが、PtSLC34-2 RNAi 株は Pi 飢餓環境下にて WT と比較して約 2/3 の活性を示した。次に PtSLC34-2 および PtSLC34-5 と FLAG の融合タンパク質を発現させた株でウェスタンブロットを行ったところ、不溶性画分において FLAG 融合タンパク質の発現を確認した。先行研究において確認された GFP 融合タンパク質と同様に、PtSLC34-2:FLAG および PtSLC34-5:FLAG は細胞膜に局在すると考えられた。続いて、FLAG 融合タンパク質発現株の Pi 取り込み活性を測定した結果、PtSLC34-5:FLAG 株は WT と同程度の取り込み活性を示した。一方、PtSLC34-2:FLAG は高 Pi 環境下において WT と同程度の取り込み活性を示したが、Pi 飢餓環境下では、WT に対して最大 2 倍の Pi 取り込み活性を示した。また、PtSLC34-2:FLAG 株を高 Pi 環境下および Pi 飢餓環境下に順化さ

せ、FLAG 融合タンパク質の蓄積量を比較したところ、定常的プロモーターで発現を駆動しているにも関わらず、高 Pi 環境下で PtSLC34-2:FLAG の蓄積量が減少していた。この結果から、高 Pi 環境では Pi 輸送体を積極的に分解する機構が存在することが明らかになった。以上の結果より、*P. tricornutum* が Pi 飢餓環境で誘導する Pi 取り込み活性の一部は、PtSLC34-2 が担っていることが強く示唆された。さらに、Pi 輸送体の蓄積量は、転写制御だけではなく翻訳後の迅速な分解により厳密に制御されていることが明らかになった。この結果から、Pi 輸送体は珪藻における Pi ホメオスタシスの厳密な調整に寄与していると考えられる。